

**DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN CARNE DE BOVINO POR MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE INHIBICIÓN EN PLACA UTILIZANDO *Bacillus subtilis*
BGA EN DOS PLANTAS DE BENEFICIO MUNICIPAL DEL ESTADO DE
JALISCO, MÉXICO**

ROGER ALEXIS ESPITIA DÍAZ

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
VILLAVICENCIO
2016**

**DETECCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN CARNE DE BOVINO POR MÉTODO
MICROBIOLÓGICO DE INHIBICIÓN EN PLACA UTILIZANDO *Bacillus subtilis*
BGA EN DOS PLANTAS DE BENEFICIO MUNICIPAL DEL ESTADO DE
JALISCO, MÉXICO**

**ROGER ALEXIS ESPITIA DÍAZ
Código 12100-3035**

**Proyecto de investigación presentado para optar al título de Médico
Veterinario Zootecnista**

**Directora María Cristina Hernández Martínez
MVZ. Esp. cMSc
Universidad de los Llanos**

**Codirector Carlos Pacheco Gallardo
MVZ. Esp.
Universidad de Guadalajara**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS ANIMALES
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
VILLAVICENCIO
2016**

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	4
2.	OBJETIVOS	7
2.1.	OBJETIVO GENERAL	7
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1.	MERCADO CÁRNICO MUNDIAL	8
3.2.	MERCADO CÁRNICO EN MÉXICO	8
3.3.	INOCUIDAD DE LA CARNE DE BOVINO	10
3.4.	ANTIBIÓTICOS	11
3.4.1.	Penicilina	14
3.4.2.	Sulfamidina	15
3.4.3.	Estreptomicina.....	16
3.5.	RESIDUOS ANTIBIÓTICOS EN CARNE BOVINA	17
3.6.	<i>Bacillus subtilis</i>	19
3.7.	DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS	20
3.8.	<i>Codex Alimentarius</i>	22
3.9.	LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS (LMR)	23
4.	METODOLOGÍA	24
4.1.	ÁREA DE ESTUDIO	24
4.2.	UNIDADES DE MUESTREO	25
4.3.	MATERIALES Y TOMA DE MUESTRA	25
4.4.	TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	26
4.5.	PRINCIPIO DE LA PRUEBA	28
4.6.	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	29
4.7.	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA SENSIDISCOS	31
4.8.	MÉTODO PARA SIEMBRA DE MUESTRAS	32
4.9.	LECTURA DE LAS PLACAS	33
4.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
6.	CONCLUSIONES.....	41
	BIBLIOGRAFÍA.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Determinación de antimicrobiano según pH del medio de cultivo	28
Tabla 2. Registro de resultados según halo de inhibición	35
Tabla 3. Distribución porcentual de penicilina en músculo en las PBM	36
Tabla 4. Distribución porcentual de penicilina en riñón en las PBM.....	36
Tabla 5. Chi cuadrado penicilina músculo y riñón.....	37
Tabla 6. Distribución porcentual de sulfamidina en músculo en las PBM	37
Tabla 7. Distribución porcentual de sulfamidina en riñón en las PBM	38
Tabla 8. Chi cuadrado sulfamidina músculo y riñón.....	38
Tabla 9. Distribución porcentual de Estreptomicina en músculo en las PBM	39
Tabla 10. Distribución porcentual de Estreptomicina en riñón en las PBM.....	39
Tabla 11. Chi cuadrado Estreptomicina músculo y riñón	40
Tabla 12. Distribución porcentual de muestras.	41

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Canales de bovino	25
Imagen 2. Preparación de medios de cultivo	29
Imagen 3. Esterilización de medios de cultivo	30
Imagen 4. Preparación soluciones antimicrobianas.....	32
Imagen 5. Incubación de cajas de Petri	33
Imagen 6. Observación de halos	34
Imagen 7. Medida de los halos	35

NOTA DE ACEPTACIÓN

María Cristina Hernández Martínez
Directora

Jorge Luis Parra Arango
Jurado

Johnny Corredor Sarmiento
Jurado

Villavicencio, 2016

RESUMEN

Desde el descubrimiento de los antibióticos en los primeros años del siglo XX, su uso habitual en el campo de la medicina veterinaria contribuyó al control y erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de interés zootécnico o de compañía llegando a ser empleados profilácticamente como promotores de crecimiento con el propósito de mejorar sus índices productivos. Pero al usarse estos de manera indiscriminada y sin tener en cuenta los tiempos de retiro, la presencia de residuos de antimicrobianos en carne empieza a representar un riesgo para la salud pública ya que los consumidores podrían presentar resistencia bacteriana y en algunos casos hipersensibilidad. Por lo anterior, con este proyecto de investigación se pretendió detectar residuos de inhibidores bacterianos mediante una prueba microbiológica alternativa al del bioensayo propuesto en la norma oficial mexicana, empleando la prueba oficial Alemana de difusión en placa que utiliza como indicador *Bacillus subtilis* BGA. Se usaron placas con medios de cultivo a diferentes pH (6, 7,2 y 8) para determinar la presencia de antimicrobianos de los grupos β -láctamicos (Penicilina), Aminoglucósidos (Estreptomina) y Sulfamidas (Sulfamidina). Se tomaron un total 242 muestras (de riñón y músculo), siendo divididas estas en 112 muestras de la planta de beneficio 1 y 130 de la planta de beneficio 2; luego de ser procesadas todas las muestras con el método microbiológico antes mencionado, se obtuvieron resultados que para penicilina en músculo hubo 10 (4,1%) muestras positivas, igual número de muestras positivas se obtuvieron en penicilina en riñón (4,1%), en sulfamidina en riñón se encontraron 11 (4,5%) muestras positivas y en estreptomina en músculo 9 (3,7%); en las pruebas para sulfamidina en músculo y estreptomina en músculo no se encontraron muestras positivas, arrojando que en mayor medida se encuentran residuos de antimicrobianos en riñón.

Palabras clave: Antimicrobiano, método microbiológico, *Bacillus subtilis* BGA, β -láctamicos, Aminoglucósidos, Sulfamidas.

ABSTRACT

Since the discovery of antibiotics in the early years of the twentieth century, its usual use in the field of veterinary medicine has contributed to the control and eradication of infectious diseases of bacterial origin in animals of zootechnical interest or companion becoming prophylactically employed as promoters of growth with the purpose of improving their productive indexes. But by using these indiscriminately and without taking into account withdrawal times, the presence of antimicrobial residues in meat begins to pose a risk to public health as consumers could have bacterial resistance and in some cases hypersensitivity. Due to the above, this research project aimed to detect residues of bacterial inhibitors by means of a microbiological test alternative to that of the bioassay proposed in the official Mexican standard, using the German official plaque diffusion test using *Bacillus subtilis* BGA as indicator. Plates with different pH (6, 7.2 and 8) culture media were used to determine the presence of antimicrobials of the β -lactams groups (Penicillin), Aminoglycosides (Streptomycin) and Sulfamides (Sulfamidine). A total of 242 samples (kidney and muscle) were taken, and these were divided into 112 samples from the benefit plant 1 and 130 from the benefit plant 2; after all the samples were processed with the microbiological method mentioned above, results were obtained for penicillin in muscle, with 10 (4.1%) positive samples, equal number of positive samples were obtained in penicillin in the kidney (4.1%), , In sulfamidine in kidney 11 (4.5%) were positive and in streptomycin in muscle 9 (3.7%), in the tests for muscle sulfamidine and streptomycin in muscle, no positive samples were found, showing that to a greater extent antimicrobial residues are found in the kidney.

Key words: Aantimicrobial, microbiological method, *Bacillus subtilis* BGA, β -lactams, Aminoglycosides, Sulfamides.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme apoyado en todo el camino sin dudar ni desfallecer.

A mi alma mater Universidad de los Llanos por la oportunidad de formarme como profesional y abrir puertas con otros países.

A la Dra. María Cristina Hernández Martínez por haberme guiado en este último gran paso para alcanzar el título profesional.

Al Dr. Carlos Pacheco Gallardo quien fue maestro y tutor y me brindó la oportunidad de realizar el presente estudio de investigación.

A los jurados de calificación, Dr. Jorge Luis Parra Arango y Dr. Jhonny Corredor Sarmiento, maestros y guías al ayudarme a concluir exitosamente el presente trabajo.

A la Dra. Delia Guillermina González Aguilar Directora del departamento de Salud Pública de la Universidad de Guadalajara, quien me abrió las puertas de una nueva oportunidad y me recibió como estudiante de intercambio permitiéndome así un crecimiento académico y personal al conocer otra cultura.

A la Dra. Elisa Cabrera Díaz directora del Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, por brindarme los espacios para realizar el presente estudio y por haberme dado la oportunidad de pertenecer a este laboratorio donde tuve el placer de conocer y trabajar con grandes personas a quienes considero grandes amigos.

Y a todos los amigos que hice en este viaje llamado época universidad, que en mi caso fue más largo de lo habitual, pero que valió toda la pena del mundo.

DEDICATORIA

A mis padres por nunca desfallecer y siempre creer y por su incondicional apoyo y confianza hasta en los momentos en que yo la había perdido. Esto y cada victoria obtenida les pertenecen a ustedes y es para ustedes.

Gracias totales.

1. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento de los antibióticos en los primeros años del siglo XX, su uso habitual en el campo de la medicina veterinaria, contribuyó al control y erradicación de enfermedades infecciosas de origen bacteriano en animales de interés zootécnico o de compañía, llegando a ser empleados profilácticamente como promotores de crecimiento hacia la década de los años 50, con el propósito de mejorar sus índices productivos. El uso indiscriminado y el no respetar el tiempo de retiro de los antibacterianos, causó que en los años 60s se detectará resistencia a la penicilina y en los 70s multirresistencia a las ampicilinas, al punto que la Comunidad Europea eliminó como promotores de crecimiento aquellos antibióticos que también fueran utilizados en la medicina humana o en veterinaria; de este modo, se prohibió en Europa el empleo de tetraciclinas o β -láctamicos como promotores en el alimento de animales (Fajardo, 2011).

En muchos países en desarrollo, aún hoy en día, se siguen detectando residuos de antimicrobianos en alimentos de origen animal, remarcando así un creciente problema en salud pública, por el riesgo de que al ingerir estos productos puedan causar hipersensibilidad o reacciones adversas en los humanos. A consecuencia de esto, muchas enfermedades comunes del hombre han generado resistencia a la acción de los antibióticos, principalmente, por la presión selectiva del empleo de estas sustancias, la presencia de genes resistentes, la aplicación terapéutica sin supervisión de un profesional y la libre comercialización de estos productos, entre otros factores, que agravan aún más la problemática.

Ante este panorama, las instituciones sanitarias internacionales promueven medidas eficaces de control y vigilancia en la calidad e inocuidad de los alimentos de origen animal que se ofertan para los humanos. Pero indiscutiblemente para poder hacer realidad esta necesidad, cada país debe disponer de los recursos económicos, tecnológicos y humanos suficientes, que le permitan garantizar el cumplimiento de los límites máximos de residuos (LMR) sugeridos en cada uno de los alimentos sometidos a vigilancia, partiendo desde los principios de la prevención, con el uso adecuado de los antibióticos en los animales en producción y la vigilancia y control de los factores de riesgo en el procesamiento de los alimentos. Así mismo, y en consideración al gran número de muestras para analizar y al amplio abanico de posibles antimicrobianos a determinar, resulta inviable utilizar como primera prueba de laboratorio aquellas de alta especificidad, debido a los elevados costos en que se incurrirían y a la laboriosidad de las mismas.

Este escenario, ha llevado a las instituciones sanitarias de México, a la necesidad de implementar programas de control en los cárnicos, empleando metodologías de análisis cuantitativo para determinar residuos de antibióticos, con la alternativa de métodos “screening” que aplican pruebas microbiológicas de tipo cualitativo, que indican la presencia o ausencia de un antimicrobiano específico; siendo más eficaces en función del costo y rapidez en los resultados, con una alta tasa de sensibilidad que ha ido evolucionando con los años. Por ejemplo en Alemania, dentro de estas técnicas microbiológicas cualitativas, están las que emplean el *Bacillus subtilis* como marcador de inhibidores bacterianos, que a diferentes niveles de pH, permite la detectar diversas familias de compuestos antimicrobianos que son empleados rutinariamente en medicina veterinaria con fines terapéuticos o profilácticos en el tratamiento de grandes animales.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) de México, emite el Acuerdo por el que se establecen los criterios para determinar los límites máximos de residuos tóxicos y contaminantes, de funcionamiento de métodos analíticos, el programa nacional de control y monitoreo de residuos tóxicos en los bienes de origen animal, recursos acuícolas y pesqueros, y programa de monitoreo de residuos tóxicos en animales, así como el módulo de consulta, los cuales se encuentran regulados por la misma SAGARPA, con el fin de asegurar que el suministro de alimento a los consumidores, no rebasen los límites máximos permisibles para este tipo de residuos y así participar con mayor confianza en el comercio internacional.

Considerando que la inocuidad de la carne es un aspecto fundamental en el mejoramiento de la cadena cárnica bovina, México, en las últimas décadas ha venido implementando en el territorio nacional, normatividad que cumpla con las medidas sanitarias y fitosanitarias demandadas por los mercados internacionales, en busca de asegurar la ausencia de residuos de sustancias inhibidoras bacterianas en las canales y subproductos comestibles del bovino, permitiéndole acceder a acuerdos comerciales con países de estándares sanitarios más exigentes, y a su vez, ofertar a los consumidores locales o nacionales productos de calidad e inocuidad, comprobada técnicamente.

El Estado de Jalisco aportó el 17,9% del total de las 509.958 toneladas de carne en canal de bovino que se obtuvo durante el 2014 en México, según reportó el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), posicionándolo como el segundo productor de carne bovina del país. De allí la importancia de conocer datos verídicos que nos aproximen a la realidad de la inocuidad de la carne que se comercializa actualmente, no sólo en esta zona, sino en la totalidad del territorio mexicano; específicamente en cuanto al control de residuos antimicrobianos.

Al respecto, se hallan trabajos realizados en otros animales de abasto, como en carne de cerdo; donde Orozco *et al.* (2006), analizaron 74 muestras de tejido muscular y hepático, encontraron 43% de resultados positivos a presencia de inhibidores microbianos por el método microbiológico de inhibición en placa utilizando *Bacillus subtilis* BGA y un agar nutritivo a tres pH's: 6,0; 7,2 con trimetoprim y 8,0, según técnica desarrollada por Bogaerts y Wolff (1985), en dos plantas de beneficio municipal (PBM) de la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco. Y Hernández y Lazarín (2007), analizando 278 muestras de músculo y riñón de cabra y 47 de ovinos, utilizando el método anteriormente mencionado, encontraron un 5% y 4,2% de muestras positivas a penicilina y tetraciclina respectivamente en la misma ciudad.

En el Estado de Michoacán, aledaño al Estado de Jalisco, Hernández *et al.* (2005) en su estudio empleando la técnica de electroforesis en gel con alto voltaje en 70 muestras de carne y riñón de bovino encontraron un 56% de positividad a residuos de tetraciclinas en la PBM de Sahuayo. Sin cuantificarse en ninguno de ellos las posibles pérdidas económicas que acarrearía el rechazo de las canales, ni los efectos sobre la salud humana por residualidad de antimicrobianos en la carne.

Por lo anterior, con este proyecto de investigación se pretendió detectar residuos de inhibidores bacterianos mediante una prueba microbiológica alternativa al del bioensayo propuesto en la norma oficial mexicana, empleando la prueba oficial Alemana de difusión en placa que utiliza como indicador *Bacillus subtilis* BGA, siendo un método de tres placas a diferentes pH (6, 7,2 y 8) para determinar la presencia de antimicrobianos de los grupos β -láctamicos (Penicilina), Aminoglucósidos (Estreptomycina) y Sulfamidas (Sulfamidina) en muestras de tejido muscular y renal procedentes de canales de bovinos con destino al consumo humano en dos PBM del Estado de Jalisco en México: Estos antimicrobianos se seleccionaron por ser catalogados dentro de las de mayor número de reacciones adversas en humanos y de mayor uso pecuario.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante método microbiológico la presencia de residuos de tres grupos de inhibidores bacterianos en productos cárnicos bovinos procedentes de dos plantas de beneficio municipal del Estado de Jalisco, México.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la presencia de penicilina, sulfamidina y estreptomicina en muestras de carne y riñón de bovinos sacrificados en dos plantas de beneficio municipal del Estado de Jalisco, México, por método microbiológico.
- Emplear un método alternativo microbiológico con *Bacillus subtilis* BGA propuesto por la Universidad de Guadalajara, para la determinación de residuos de inhibidores bacterianos a partir de muestras de músculo y riñón de bovinos recién sacrificados.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. MERCADO CÁRNICO MUNDIAL

Desde el 2.001, los mercados mundiales de la carne se han caracterizado por las crisis relacionadas con la sanidad animal. La reacción de los consumidores ante la preocupación por la inocuidad de los alimentos ha hecho subir los precios de la carne procedente de países exentos de enfermedades. La demanda de carne en los países en desarrollo continúa viéndose impulsada por el aumento de ingresos y el crecimiento demográfico, y fortalecida por tendencias como la urbanización y las variaciones en las preferencias y hábitos alimentarios (OCDE-FAO, 2005). En un escenario de continuo crecimiento económico en países en desarrollo se mantendrá este desplazamiento constante hacia un contenido mayor de proteínas en la alimentación y, por consiguiente, hacia un consumo mayor de carne. Es por ello que las perspectivas prevén hasta 2014 un crecimiento ulterior, aunque tendencialmente moderado, del consumo, la producción y el comercio mundial de carne, dando lugar a un mercado generalmente activo.

Durante el año 2.013 en el mercado cárnico mundial se comercializaron 114,5 millones de Toneladas (Ton) de carne de cerdo (37,13%), 106,4 millones de Ton. carne de pollo (34,51%), 67,8 millones de Ton. de carne de bovino (21,99%); representando éstas, el 93,63% de la producción mundial total (FAO, 2014).

3.2. MERCADO CÁRNICO EN MÉXICO

De acuerdo con el Atlas de la carne, realizado por la organización Heinrich Böll Stiftung, México es uno de los 10 mayores productores de carne bovina en el mundo pero también es fuerte produciendo carne de cerdo y de pavo. El estudio señala que la producción de carne en 2.013 en México fue de 1.775.000 toneladas de carne bovina, 3.000.000 toneladas de ave y 1.270.000 tonelada de porcino, con

lo que el país ocupó el octavo lugar en la producción de bovino y porcino y el sexto en producción de carne de ave (Chávez, 2014).

En México se explotan alrededor de 30 razas bovinas de uso cárnico, entre las más importantes están: Angus, Hereford, Charolais, Nelore, Pardo Suizo Europeo y Angus. Obteniéndose casi 2 millones de toneladas/año, de las cuales casi el 85% se exporta a Estados Unidos. Los principales estados productores de carne de res son: Veracruz con 249 mil Ton/año y Jalisco con 209 mil Ton/año, le siguen estados como Chiapas, Sinaloa y Baja California (SAGARPA, 2015). El consumo de carne bovina en México pasó de 23 Kg/hab/año en 1970 a 34 Kg/hab/año en 1990, pero en 2013 cada persona consumió 63 Kg de carne; es decir que en cuatro décadas el consumo de carne aumentó en 40 Kg (Chávez, 2014).

En el 2014, en 881 PBM distribuidos en el territorio nacional, se contabilizaron 6,6 millones de cabezas de ganado sacrificadas, generando una producción de carne en canal de 823,418 Ton, de las cuales el 66,3% fueron de la especie porcina, 31% bovina, 1,8% ovina y el 0,9% restante de ganado caprino. El precio medio por tonelada de carne en canal se situó en los \$ 42.827, lo que significó un crecimiento anual del 11,3%. De las 509,958 toneladas de carne en canal de ganado bovino, Jalisco generó el 17,9% (INEGI, 2014). En 2015, se sacrificaron 1.352.687 cabezas de ganado en los PBM y 2.579.641 cabezas de ganado sacrificado en plantas de beneficio (PB) Tipo Inspección Federal (TIF) de México, con 1.850.133 de tonelada peso canal (INEGI, 2015).

Jalisco y Veracruz, estados del centro y sur de México, se ostentan como los principales productores de carne de bovino, produciendo carne clasificada en centros de sacrificio TIF al igual que otros estados del sureste de México. La infraestructura disponible en cuanto a centros de sacrificio a nivel nacional está compuesta por PBM, privados y TIF. Los estados con mayor infraestructura son Jalisco y Michoacán con más de 100 PB ubicados en su territorio, sin embargo destacan el Estado de México, Sonora y Nuevo León con más PB TIF en proporción al total de centros de sacrificio en sus territorios, lo cual los ubica a la vanguardia en la aplicación de esta normatividad y en la producción de carne clasificada a nivel nacional (UGR.BJ, 2009).

Jalisco produce uno de cada cuatro kilos de carne bovina; dos de cada cinco kg de carne porcina y cuatro de cada diez kg de pollo del volumen nacional. Uno de cada diez centros de sacrificio en México es tipo TIF, lo cual garantiza la calidad de la carne, condición que abre puertas a mercados externos (SAGARPA, 2011). En Jalisco, los municipios de mayor actividad ganadera son Tomatlán, Mezquitic,

Talpa, Tepatitlán, Ameca, Villa Purificación, Casimiro Castillo y Cuautitlán de García Barragán (Zúñiga, 2014). En el municipio de Zapopan se reportó el sacrificio de 8.857 bovinos y la obtención de 2.489.059 Ton/año de carne en 2014 (SAGARPA, 2014).

3.3. INOCUIDAD DE LA CARNE DE BOVINO

Se considera que la carne, productos cárnicos comestibles y derivados cárnicos están adulterados, siempre que lleven o contengan cualquier sustancia tóxica o nociva que haya sido intencionalmente adicionada en cualquier etapa de la cadena alimentaria y que sea perjudicial para la salud; o que contengan residuos químicos no autorizados, o que excedan los límites máximos permitidos (MPS, 2007).

En la mayoría de países industrializados existen diversas reglamentaciones que pretenden lograr el equilibrio entre la pérdida económica para el productor y los niveles inocuos tolerables para el ser humano (Sumano y Ocampo, 2006). Se considera que las condiciones de inocuidad de la carne son un requisito indispensable para mejorar la competitividad de la cadena cárnica bovina y el acceso a mercados internacionales (Conpes 3375, 2005; Conpes 3676, 2010). Los residuos de medicamentos tienen dos tipos de consecuencias: Tecnológicas y sanitarias, con repercusiones comerciales y económicas (Baraton, 2006).

Los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal pueden generar productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, pudiendo producir toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros (Doyle, 2006). El riesgo que implica el consumo de contaminantes presentes en alimentos, entre ellos residuos de fármacos, debe ser valorado y evitar, a través de reglamentaciones, el consumo de dosis tóxicas de sustancias adversas a la salud. Este proceso conocido como evaluación del riesgo consta de cuatro componentes que son: Identificación del peligro, en el que se determina si una sustancia genera efectos adversos. Evaluación de la curva dosis-respuesta, donde se cuantifica esta relación. Estimación de la exposición, en la que se reconocen niveles de exposición potencialmente nocivos. Y caracterización del riesgo, que estudia toda la información recopilada en las etapas anteriores y genera recomendaciones para

manejar el riesgo (Faustman *et al.*, 2001). A través de la información generada en estas etapas puede determinarse la ingesta diaria admisible (IDA) que se usa para calcular los límites máximos de residuos (LMR) de los contaminantes (Anadón y Martínez-Larrañaga, 1999).

El interés por reconocer y dado el caso reducir este tipo de residualidad, debe empezar por la vigilancia y control de los factores de riesgo en la producción de alimentos, particularmente en las empresas pecuarias e industrias procesadoras. En este sentido, la rastreabilidad, definida como la capacidad para seguir el desplazamiento de un alimento a través de una o varias etapas especificadas de su producción, transformación y distribución (FAO, 2006), ofrece una oportunidad para reconocer, establecer y controlar la fuente de residuos en la producción primaria campesina. Así mismo, las industrias procesadoras de alimentos están en la obligación de determinar la calidad de sus insumos y exigir a sus proveedores. Todos estos aspectos deben ir en consonancia con las reglamentaciones promulgadas por las diferentes instituciones estatales (Lozano y Arias, 2008).

Sin embargo, a pesar de estos controles y signos de alerta, aún se presentan eventos infortunados de reacciones adversas como el sucedido en noviembre de 2005 en Jalisco, México, donde alrededor de 225 personas experimentaron temblor, dolor de cabeza y malestar después de haber consumido carne de res que contenía residuos de antimicrobianos (Doyle, 2006).

3.4. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias de origen químico o natural mediante metabolitos obtenidos en un proceso de fermentación, elaboradas por numerosas especies de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos), que actuando sobre otros microorganismos son capaces de suprimir su crecimiento y multiplicación (acción bacteriostática) o eventualmente provocar su destrucción (acción bactericida) (Malgor y Valsecia, 2000; Sumano y Ocampo, 2006). El uso de antibióticos ha contribuido al control de enfermedades bacterianas y en el campo de la producción ha mejorado el rendimiento productivo de los animales Falcón *et al.*, 2010).

Los agentes quimioterapéuticos tienen la propiedad de una toxicidad selectiva, ya que afectan a las células microbianas invasoras sin afectar significativamente las células del organismo. Los antibióticos constituyen una clase de agentes quimioterapéuticos producidos a partir de diferentes especies de microorganismos que suprimen el crecimiento de otros, llegando, a veces, a destruirlos, siendo una clase especial que se distinguen por ser sustancias naturales (productos de la actividad microbiana), más que sustancias químicas sintéticas (productos de la actividad humana). Pero en algunos casos, los antibióticos incrementaron su eficacia por medio de las modificaciones químicas (semi-sintéticos) (Pérez, 2005).

Otro uso de los antibióticos, es su aplicación como promotores del crecimiento, especialmente en crianza intensiva de animales de carne, tienen efecto al inhibir bacterias entéricas de baja toxicidad, sirven de nutrimentos accesorios a las células e incrementan la actividad enzimática para el metabolismo celular antibacteriano (Okolo, 1986).

Como promotores de crecimiento aumentan la ganancia de peso y la eficiencia de la conversión alimenticia. Se agregan al alimento para minimizar las infecciones bacterianas secundarias, y controlar abscesos hepáticos, comunes en engorde de ganado. Los más usados son: Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Bacitracina y Tilosina, mientras que de los Ionóforos, el más empleado es monensina, cuya acción cambia la digestión ruminal, seleccionando comunidades de microbios que producen proporcionalmente más ácido propiónico (AP) que otro ácido graso volátil (AGV); esta mayor producción de AP recupera energía utilizable al reducir la formación de gases de desecho, ya que para su síntesis se utilizan más cofactores reducidos que los otros AGV, ayuda a inhibir la producción de ácido láctico reduciendo la acidosis, en consecuencia previene la laminitis, controla la coccidiosis, evitando así diarreas y atrasos en el engorde debidos a parasitosis (Bavera *et al.*, 2002).

El uso incorrecto de antibióticos, puede generar el desarrollo de resistencia bacteriana en animales tratados. Estas bacterias resistentes podrían transmitirse al hombre causando dificultades en el momento de tratar infecciones humanas, por ejemplo se han encontrado microorganismos coliformes antibiótico-resistentes en carne cruda y cocida. Así mismo, los antibióticos consumidos por seres humanos provenientes de residuos presentes en alimentos de origen animal, generan una alteración de la flora intestinal y como consecuencia una disminución

de bacterias que compiten con microorganismos patógenos, aumentando así el riesgo de enfermedad (Doyle, 2006; Falcón *et al.*, 2010).

Varios antibióticos han reportado desencadenar reacción alérgica, o causar hipersensibilidad, o ambas situaciones, entre ellos se encuentran la Penicilina, Sulfonamidas y Estreptomicina. Respecto de la Penicilina se han dado casos en los que personas sensibles experimentan reacciones alérgicas por el consumo de residuos en carne, estimándose que 10 UI (0,6 µg) pueden causar reacciones como prurito general, dificultad para tragar y hablar, disnea, dermatitis por contacto y urticaria (Woodward, 2005; Doyle, 2006;).

Los antibióticos de amplio espectros utilizados durante décadas para el tratamiento de infecciones bacterianas, junto con el uso indiscriminado de éstos por parte de los pacientes para tratar cualquier tipo de infección, han llevado a que las bacterias se hagan resistentes a una gran parte de los antibióticos existentes, dificultando así el tratamiento de procesos infectivos bacterianos que hasta el momento tenían una cura efectiva (Domínguez-Domínguez, 2012).

De ahí la importancia del “tiempo de retiro”, que depende de las dosis suministradas de cada fármaco y está pensado para que los residuos antibióticos declinen a concentraciones seguras, antes de que los animales sean llevados a una planta de sacrificio. El cumplimiento de este tiempo es esencial para garantizar la inocuidad de la carne del animal. Para ello, se requiere evidencia científica como parte del control oficial que debe ejercer la autoridad competente, para determinar si se han eliminado todos los residuos perjudiciales del fármaco (Clavijo, 2015).

La localización de estos residuos es variable. El tejido muscular y la grasa, son los lugares preferentes, aunque también se han identificado en los tejidos menos consumidos, como son el hígado o el riñón. La toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad, hasta presentar consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo-patológicas o incluso, causar la muerte. La desaparición de estos residuos puede ser rápida no dejando restos, o muy pocos, en los tejidos comestibles. Otros, en cambio, pueden originar residuos cuya desaparición es difícil necesitando un largo periodo para su eliminación o incluso, la prohibición de su uso. Resulta por ello necesario, establecer Límites Máximos de Residuos (LMR) para aquellas sustancias farmacológicas activas, que se utilizan en los medicamentos veterinarios (FAO, 2002).

En una revisión sistemática de estudios prospectivos entre 2000 y 2012, realizada en México por Cota-Rubio *et al.* (2014) sobre resistencia a antibióticos en cepas bacterianas aisladas de animales de granja destinados al consumo humano, analizando diferentes grupos de antibióticos: β -láctamicos, macrólidos, glucopéptidos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y sulfamidas, se encontró que predominó la resistencia a los β -láctamicos. Siendo evidente que el uso indiscriminado de antibióticos en animales destinados al consumo ha contribuido al fenómeno de resistencia, lo que es considerado un problema de salud pública.

3.4.1. Penicilina

Son sustancias antibacterianas naturales o semi-sintéticas, que derivan, directa o indirectamente, de cepas de hongos del género *Penicillium* y otros hongos del suelo, cultivados en medios especiales. Las penicilinas ejercen un efecto tanto bactericida como bacteriostático, ya que interfieren en los últimos pasos de la síntesis del peptidoglicano, una sustancia de la pared celular de la bacteria, proceso que no tiene lugar en las células de los mamíferos. Esto explica la acción selectiva de las penicilinas, pero no su relativa falta de toxicidad (Anadón, 2007). A pesar de su toxicidad relativamente baja para el huésped, son activas frente a muchas bacterias, especialmente Gram-positivas patógenas, ciertas formas Gram-negativas, algunas espiroquetas y algunos hongos. Los efectos colaterales de las penicilinas son poco frecuentes. Cuando aparecen, consisten en hipersensibilidad inmediata o retardada, erupciones cutáneas, fiebre y shock anafiláctico (reacciones anormales) (Pérez, 2005; Sumano y Ocampo, 2006).

Las dos especies de hongos, más conocidos utilizados, para extracción de penicilina son el *Penicillium notatum*, y *Penicillium chrisogenum*, especialmente éste último, del cual una cepa mutante por exposición a rayos x, produce una cantidad más elevada de Penicilina. La penicilina, se obtiene en la actualidad de cultivos sumergidos en tanques de 30.000 a 60.000 litros de un medio de cultivo líquido, que luego se filtra, extrayéndose penicilina del filtrado con disolventes orgánicos a un pH determinado. En 1949, los métodos de fermentación mejoraron significativamente, disponiéndose desde entonces de cantidades ilimitadas para su uso. La penicilina natural que ganó preferencia médica, es la Bencilpenicilina o

penicilina G, ha demostrado ser superior a las otras y por lo tanto es la más utilizada (Malgor y Valsecia, 2000).

Los β -láctamicos suelen ser ampliamente distribuidos a través de todo el cuerpo. La mayoría de las drogas alcanzan niveles terapéuticos en los riñones, hígado, corazón, piel, pulmones, intestinos, bilis, hueso, próstata y líquido peritoneal, pleural y sinovial. La mayoría de β -láctamicos se excreta con rapidez y sin cambios a través de los riñones en la orina por medio de filtración glomerular y secreción tubular. Por lo general son bactericidas contra las bacterias susceptibles y actúan por inhibición de la síntesis de mucopéptido en la pared celular. Se ha demostrado que los antibióticos β -láctamicos se unen dentro de la membrana citoplasmática de la bacteria a varias enzimas (carboxipeptidasas, transpeptidasas, endopeptidasas) involucradas en la síntesis de la pared celular (Donald y Plumb, 2010)

Las penicilinas tienen baja toxicidad, aunque es importante señalar que es probable enfrentarse a una reacción alérgica con cualquiera de ellas. Los signos de esa reacción van desde urticaria, diarrea, edema generalizado y otros signos que no amenazan la vida del paciente, hasta choques anafilácticos agudos de consecuencias fatales. (Sumano y Ocampo, 2006).

Muchos antibióticos utilizados en el ganado son los mismos a los prescritos para el tratamiento de un gran número de infecciones en humanos. Las bacterias pueden desarrollar resistencia a uno o más antibióticos. Entre las sustancias utilizadas con más frecuencia está las tetraciclinas y penicilinas (Errecalde, 2004).

3.4.2. Sulfamidina

Las sulfas fueron las primeras drogas usadas efectivamente para combatir las infecciones, y junto al descubrimiento de los antibióticos significaron uno de los más grandes avances terapéuticos de los tiempos modernos. La morbi-mortalidad por infecciones disminuyó en forma considerable desde el uso clínico de las sulfas y antibióticos se generalizó. Debido a la aparición de resistencia bacteriana y al descubrimiento de fármacos más activos y menos tóxicos, las sulfas fueron

dejadas de lado por mucho tiempo. Actualmente, con la recuperación de la sensibilidad de algunas bacterias y la aparición de la trimetoprima que se combina con las sulfas, sinergizándola, las sulfas reconquistaron indicaciones importantes en quimioterapia antimicrobiana. Se han sintetizado muchos compuestos y solo algunos tienen valor terapéutico. Todas tienen el mismo mecanismo de acción, y sus diferencias son generalmente farmacocinéticas (Malgor y Valsecia, 2000).

Su actividad antibacteriana radica en ser antagonistas del Ácido paraaminobenzoico (PAB), metabolito fundamental en el crecimiento de bacterias. Por su semejanza estructural, las sulfamidas ocupan el lugar de este ácido en la síntesis de ácido fólico, obteniéndose un compuesto sin actividad vitamínica (Domínguez, 2012). Son bacteriostáticos sintéticos de amplio espectro, eficaces contra la mayor parte de bacterias Gram-positivas y muchas Gram-negativas. Todas las sulfamidas tienen cierto carácter tóxico, cuando se emplean indiscriminadamente producen anomalías sanguíneas y lesiones renales. Los efectos colaterales incluyen alteraciones del tracto gastrointestinal e hipersensibilidad. La trimetoprima es capaz de provocar resistencia bacteriana especialmente de los bacilos Gram-negativos, aunque también en estafilococos, pero como el mecanismo de acción de la trimetoprima y las sulfonamidas es de tipo diferente, la unión de ambas clases de drogas hace que la aparición de la resistencia se reduzca. (Pérez, 2005).

La residualidad de sulfonamidas (sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxazol) empleadas en el tratamiento a animales destinados para el consumo humano de infecciones como coccidiales, bacterianas o como promotor de crecimiento, pueden causar hipersensibilidad principalmente prurito cutáneo; sin embargo, se desconocen manifestaciones anafilácticas ocasionadas por este tipo de residuos (Paige *et al.*, 1999).

3.4.3. Estreptomina

La estreptomina es un antibiótico aminoglucósido muy utilizado. Debido a su uso muy extendido, muchas bacterias Gram-negativas, han desarrollado resistencia. Como todos los demás miembros del grupo, la estreptomina tiene mala

absorción a nivel del tubo digestivo y debe ser administrada parenteralmente, normalmente por vía intramuscular. Se utiliza mucho en terapéutica veterinaria, contrariamente a lo que ocurre en medicina humana. Fue obtenida y descrita en 1944 por Waksman, Schatz y Bugie por medio de la fermentación del actinomiceto *Streptomyces griseus*. En 1945 se obtuvo en estado de pureza. La estreptomicina se encuentra en el comercio en forma de sulfato o pantotenato. Este antibiótico permanece por bastante tiempo en los riñones luego de la administración parenteral y en el lugar de la inyección. En cambio, si la vía utilizada es la oral, permanece poco tiempo en los órganos por ser muy escasa su absorción (Pérez, 2005).

Actúan principalmente sobre bacilos aerobios Gram-negativos, con poca actividad contra anaerobios y bacterias facultativas en condiciones anaeróbicas. Su acción sobre bacterias gram positivas es limitada. Como son cationes muy polares insolubles en lípidos, se absorben poco en tracto gastrointestinal y son eliminados por heces. Sin embargo si existen ulceraciones a este nivel pueden ser absorbidos. La vía intramuscular (IM) es de elección, alcanzando concentraciones máximas en sangre en 30-90 minutos. En ocasiones se puede utilizar la vía intravenosa por infusión, aunque alcanza la misma concentración en 30 minutos de la administración IM. Los aminoglucósidos no se metabolizan, se excretan casi totalmente por filtrado glomerular. La excreción se reduce mucho, cuando existe alteración en la función renal. Gran parte de una dosis parenteral se excreta en 24 horas sin cambios y casi toda aparece las primeras 12 horas. La ototoxicidad y nefrotoxicidad tiene relación directa con la concentración del aminoglucósido, por lo tanto es necesario reducir o adecuar la dosis en insuficientes renales (Malgor y Valsecia, 2000).

Sobre la estreptomicina existen reportes de reacciones alérgicas por consumo de carnes con este tipo de residuos y solamente se ha registrado un caso de reacción anafiláctica por consumo de ternera contaminada (Woodward, 2005).

3.5. RESIDUOS ANTIBIÓTICOS EN CARNE BOVINA

Errores en la posología y el incumplimiento del tiempo de retiro, podrían generar la presencia de residuos en la carne destinada al consumo humano, pudiendo afectar la salud del consumidor por reacciones alérgicas o alteraciones de la microbiota intestinal o favoreciendo la selección de bacterias resistentes (Myllyniemi, 2004; Doyle, 2006). La aplicación a gran escala de los antibióticos conlleva una presión selectiva que ha favorecido la diseminación de cepas bacterianas resistentes (Gimeno y Ortega, 2007).

Sin embargo, dependiendo del tiempo transcurrido entre la administración de un antibiótico y el beneficio del animal o uso de sus subproductos (tiempo de espera), pueden quedar residuos de estas sustancias en los tejidos utilizados como alimento o destinados a la obtención de estos. Estos compuestos o sus metabolitos son eliminados en un gran porcentaje en las heces u orina de animales tratados. Además la presencia de residuos de antibióticos en los productos de origen animal, leche o carne destinada a la obtención de productos fermentados, puede conllevar la aparición de problemas de tipo tecnológico o económico (Gratacós, 2007). Estos residuos pueden provocar en el consumidor efectos adversos como: reacciones tóxico-alérgicas y efectos crónicos tóxicos debido a la exposición prolongada a niveles bajos de antibióticos, con el desarrollo de resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas, o interrupción de la flora intestinal normal del humano (Doyle, 2006; Gratacós, 2007). Esto ha provocado que los microorganismos desarrollen multi-resistencias, es decir mecanismos de resistencia a diferentes grupos antibacterianos y está haciendo muy difícil poder contar con un antimicrobiano eficaz (Navas, 2012).

De acuerdo con los organismos mundiales de referencia, los residuos de fármacos en alimentos de origen animal son considerados como un factor de riesgo en la salud pública y como limitante en el desarrollo económico de cualquier país. Estas razones junto con el avance de metodologías analíticas cada vez más sensibles, han hecho que los requisitos de sanidad e inocuidad exigidos en los alimentos sean cada vez más estrictos, especialmente cuando el destino de los productos es la exportación (Lozano y Arias, 2008). Los residuos de fármacos en alimentos de origen animal son considerados como un factor de riesgo en la salud pública y limitante en el desarrollo económico de cualquier país de acuerdo con los organismos mundiales de referencia (Lozano y Arias, 2008).

La carne y los productos cárnicos que contienen residuos de antibióticos que superan niveles de tolerancia no pueden destinarse para consumo humano.

Cuando los antibióticos se utilizan de forma racional, se respetan indicaciones y modo de empleo, así como el cumplimiento de tiempos de espera o de retirada, los residuos potenciales que pudieran estar presentes en los animales tratados o en sus productos y subproductos alimenticios para consumo humano estarán únicamente a niveles trazas, es decir, niveles por debajo de los límites máximos de residuos fijados, por lo que la seguridad para el consumidor no estará comprometida. Si por el contrario, los medicamentos veterinarios se utilizan de forma indiscriminada, sin cumplir las indicaciones y el modo de empleo autorizado, o sin respetar los tiempos de espera, la salud pública podría estar afectada (Anadón, 2007).

3.6. *Bacillus subtilis*

Bacteria gram positiva, aerobio facultativo, catalasa-positiva, que se encuentra comúnmente en el suelo, sus esporas pueden sobrevivir la calefacción extrema que a menudo es usada para cocinar alimento, y es responsable de causar la fibrosidad en el pan estropeado. Taxonómicamente según la segunda Edición del Manual Bergey's (1982). El género *Bacillus* pertenece a la familia I *Bacillaceae*, del orden I *Bacillales* de clase tres *Bacilli*, del fillum BXIII *Firmicutes* del Dominio bacteria. En la primera edición del género es claramente diverso desde el punto de vista fenotípico y genotípico. La diferenciación entre especies del género *Bacillus* se centró en los resultados en la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, melobiosis, hidrólisis de la urea, y descarboxilación de la lisina (Anderson *et al.*, 2003) Produce esporas, crece en un amplio rango de temperaturas, con capacidad de moverse y velocidad de crecimiento alta, produce enzimas hidrolíticas extracelulares y es sensible a una variedad de antibióticos (Espinosa de los Monteros, 2005).

Entre sus características más destacadas, está su capacidad para controlar ciertas enfermedades en cultivos vegetales. Además, produce antibióticos muy efectivos contra los hongos y, cuando se instala en las raíces y hojas, induce a la planta a producir fitoalexinas que confieren resistencia al ataque de hongos y nematodos patógenos, con grandes ventajas en comparación con los fungicidas químicos, ya que no es tóxico para humanos, animales y plantas y no constituye un contaminante ambiental. Una segunda característica es que puede ser usada para el control de enfermedades de animales, como la salmonelosis, de interés en

salud pública. Esta característica está relacionada a su capacidad para desplazar y competir por el sustrato que las bacterias patógenas necesitan para crecer y secretando sustancias con características antibióticas. Además, modifica el pH intestinal, impidiendo el desarrollo de las salmonelas (Torsten, 2005, Thomas *et al.*, 2009).

3.7. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS

Los estudios realizados con respecto a la presencia de residuos antibióticos en músculo de animales de consumo masivo es cada vez más frecuente utilizando para ello métodos microbiológicos considerados cualitativos así como analíticos conocidos como cuantitativos. El método microbiológico de difusión de las cinco placas ha sido desarrollado con el fin de detectar residuos de sustancias antibacteriales en productos de origen animal, que por su adecuada confiabilidad, fácil ejecución a gran escala y bajos costos, deberían ser consideradas en el país como métodos de rutina en la vigilancia de residuos de antibacterianos en alimentos de origen animal (Gatica y Gesche, 2007).

Otros métodos, como por ejemplo la Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y los inmunológicos, aun cuando son métodos muy sensibles, sus altos costos limitarían su uso, justificándose quizás en instituciones supervisoras a nivel gubernamental. En segundo lugar, el análisis cuantitativo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de Masa en Tandem (LCMS/MS) da con certeza la identidad del antimicrobiano así como la cantidad presente en la muestra analizada mediante picos característicos a cada sustancia y a longitudes de onda específicos. Este método es ampliamente utilizado por su sensibilidad y precisión. El método se aplica para la determinación de sulfonamidas, tetraciclinas, penicilinas, macrólidos y quinolonas en tejido animal en las concentraciones de 5 µg/kg a 200 µg/kg (Chico *et al.*, 2008).

El método de cuatro placas ha sido desarrollado con el fin de detectar residuos de sustancias antibacteriales en productos de origen animal, es aplicado como método de control en países que exportan a la Unión Europea. Es importante aclarar que no existe un método de referencia oficial. Este método fue

desarrollado por un equipo de trabajo de Comisión Científica Veterinaria de la Comunidad Europea en colaboración con expertos de nueve Estados miembros, aproximadamente en 1980. El resultado de este equipo de trabajo fue un método microbiológico estandarizado altamente sensible. El método propuesto es un test de difusión de agar de cuatro placas, en el cual se utilizan dos microorganismos diferentes (*Bacillus subtilis* BGA y *Micrococcus luteus* ATCC 9341). En realidad el test se basa en otros test existentes, siendo nuevo la placa que contiene Trimetoprima y *Bacillus subtilis*, con el fin de detectar residuos de sulfamidas. Básicamente, el test es una combinación del Test alemán: «AH-Test», del test «*Sarcina lutea*» (modificado a pH 8) y una variante del test existente para sulfonamida (Bogaerts y Wolff, 1985).

La Decisión Europea 2002/657/CE define los métodos de cribado como los “utilizados para detectar la presencia de una sustancia, o tipo de sustancias, al nivel de interés. Estos métodos permiten tratar un elevado número de muestras y se utilizan para cribar grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Están diseñados específicamente para evitar resultados de falso conforme”. Con frecuencia la etapa de cribado se basa en métodos microbiológicos porque son económicos, rápidos y de amplia gama de detección (Pikkemaat, 2009).

En el diagnóstico microbiológico, deben emplearse muestras de tejido blanco (Sin residuos) y músculo dosificado procedente de un animal al que se le administro antibiótico. Sin embargo, en producción bovina estudiar todas las muestras para cada antimicrobiano empleado a concentraciones específicas, consumiría mucho tiempo y dinero (Myllyniemi, 2004). Por lo tanto, para establecer si el bioensayo detecta la presencia de residuos antibióticos al nivel de interés en músculo y cumple los criterios de funcionamiento descritos en la Decisión Europea 2002/657/CE (CCE, 2002) y de músculo bovino fortificado a diferentes concentraciones antimicrobianas, con el objetivo de evaluar el método microbiológico del bioensayo y determinar su uso como prueba de screening para el monitoreo y vigilancia de residuos antimicrobianos en carne bovina, contribuyendo a garantizar la inocuidad alimentaria.

La técnica del FSIS (Food Safety and Inspection Service), que es el Servicio de Inspección de Inocuidad de Alimentos de Estados Unidos, se realiza en placas de vidrio, sobre las cuales se deposita un medio de cultivo líquido inoculado con microorganismos de prueba. Posteriormente se deja solidificar y se adiciona el

extracto de la muestra de carne. Si se observa inhibición del crecimiento de las bacterias, es por presencia de residuos de antibióticos. El bioensayo realizado en las siete placas se estandarizó para la detección, identificación presuntiva y semi-cuantificación de cuatro familias de antibióticos: tetraciclinas, β -láctamicos, macrólidos y aminoglucósidos, en músculo bovino destinado al consumo humano, según los lineamientos de la “Guía de laboratorio de microbiología, MLG 34.02” del USDA y el FSIS. En este tamizaje se utilizaron microorganismos de referencia como *Kocuria rhizophila* (antes *Micrococcus luteus*), *Staphylococcus epidermidis*, esporas de *Bacillus cereus* var. *mycoides* y *Bacillus subtilis* (Clavijo, 2015).

Las técnicas biológicas para detectar sustancias antimicrobianas utilizan comúnmente microorganismos tales como *Sarcina lutea*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* (Moreno, 2003)

3.8. Codex Alimentarius

En 1963, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la Comisión del *Codex alimentarius*, para desarrollar una serie de normas alimentarias, aceptadas internacionalmente, con el objetivo de proteger la salud del consumidor y asegurar prácticas equitativas en el comercio de alimentos (Villar *et al.*, 2012). El *Codex Alimentarius* es un organismo internacional creado para la elaboración de normas, códigos de prácticas, directrices y recomendaciones sobre inocuidad de los alimentos; documentos que se convierten en referentes obligados para dirimir preocupaciones o diferencias comerciales entre países miembros de Organización Mundial del Comercio, en el marco de los Acuerdos sobre Obstáculos Técnicos al Comercio y sobre Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias y cuya finalidad es la protección de la salud de los consumidores, y el aseguramiento de prácticas justas en el comercio de alimentos (CAC-ATCC, 2007).

Una de las disposiciones del *Codex alimentarius*, es la presencia de residuos de medicamentos veterinarios; por esto se especifican los límites máximos de residuos (LMR) permisibles por tejido y especie animal. Dichos niveles fueron

fijados por expertos con datos generados por instituciones sanitarias. Otras disposiciones se refieren a higiene de alimentos, aditivos, residuos plaguicidas o contaminantes, etiquetados, presentación, y métodos muestreo, inspección, análisis y certificación de niveles de importaciones y exportaciones de carne. Su finalidad, es garantizar alimentos inocuos y de calidad a todas las personas en cualquier lugar. El *Codex alimentarius*, vela para que los consumidores puedan confiar, en cuanto a la calidad de los productos que se consumen y sean formulados con la inocuidad, calidad y equidad adecuadas en el comercio internacional de alimentos (Villar *et al.*, 2012).

El grupo de acción intergubernamental sobre la resistencia a los antimicrobianos (TFAMR). Se encarga de establecer orientaciones sobre métodos y procesos de evaluación de riesgo y su aplicación a los antimicrobianos, usados en la medicina humana y veterinaria. Desarrolla sus actividades por conducto de la Reunión Conjunta de Expertos FAO/OMS en Resistencia Antimicrobiana (JEMRA) y en estrecha cooperación con la (OIE) (CAC-ATCC, 2007).

3.9. LÍMITE MÁXIMO DE RESIDUOS (LMR)

Tras la administración de un antibiótico a un animal, tiene lugar una metabolización, que favorece su eliminación y en conjunto, la detoxificación. Los residuos de cualquier medicamento veterinario, en general, son sustancias farmacológicamente activas (principios activos, excipientes o productos de degradación y metabolitos) que permanecen en los productos alimenticios obtenidos, a partir de animales a los que se les ha administrado el medicamento veterinario (Villar *et al.*, 2012).

La localización de estos residuos es variable. El tejido muscular y la grasa, son los lugares preferentes, aunque también se han identificado en los tejidos menos consumidos, como son el hígado o el riñón. La toxicidad de estos residuos varía desde la inocuidad, hasta presentar consecuencias clínicas, hematológicas, bioquímicas, anatomo-patológicas o incluso, causar la muerte. La desaparición de estos residuos puede ser rápida no dejando restos, o muy pocos, en los tejidos comestibles. Otros, en cambio, pueden originar residuos cuya desaparición es

difícil necesitando un largo periodo para su eliminación o incluso, la prohibición de su uso. Resulta por ello necesario, establecer Límites Máximos de Residuos (LMR) para aquellas sustancias farmacológicas activas, que se utilizan en los medicamentos veterinarios (FAO, 2002).

El LMR se define como aquella concentración aceptable de una sustancia en los tejidos comestibles de un animal (músculos, hígado, riñones, grasa, leche, miel y huevos) y que al ser ingerida por el ser humano, no constituye ningún riesgo para su salud. Se fijan para cada especie animal y para cada tejido. De este modo, el valor del LMR de toda sustancia farmacológicamente activa, quedará fijado como una pareja compuesta por un residuo marcador y el tejido diana correspondiente para cada especie animal productora de alimentos. Los valores de los LMR, en los diferentes tejidos deben reflejar la cinética de depleción teniendo en cuenta todas las fuentes de alimento, las condiciones de uso del medicamento, la factibilidad de los tiempos de espera derivados y la disponibilidad de métodos analíticos adecuados para su determinación (Cancho Grande *et al.*, 2000).

Los LMR establecidos por el *Codex Alimentarius* para algunos antimicrobianos de interés son: Penicilina (β -láctamicos) es de 4 $\mu\text{g/Kg}$ de carne, Sulfamidina (Sulfonamida) es de 25 $\mu\text{g/Kg}$ de carne, estreptomycin (Aminoglicósido) es de 200 $\mu\text{g/Kg}$ (*Codex alimentarius*, 2007)

4. METODOLOGÍA

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos del Departamento de Salud Pública, ubicado en el Centro Universitario

de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara, en el Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, Predio Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México, y las muestras se obtuvieron del Estado de Jalisco, México, en dos plantas de beneficio municipales (De ahora en adelante PBM), de las cuales por reserva de confidencialidad no se menciona la ubicación, ni el nombre.

4.2. UNIDADES DE MUESTREO

Se tomaron muestras de músculo esquelético en la zona diafragmática y en riñón de canales de bovinos recién faenados, sin distinción de sexo o edad, al azar en las dos PBM seleccionadas en el Estado de Jalisco (Imagen 1).



Imagen 1. Canales de bovino

4.3. MATERIALES Y TOMA DE MUESTRA

La toma de muestras fueron realizadas dando cumplimiento a las medidas de bioseguridad implantadas por la dirección de la PBM para lo cual se usaron los implementos de protección personal (Overol, botas de caucho, casco, cofia, tapabocas, peto plástico, guantes de látex, porta-cuchillos) necesarios para el ingreso al área de trabajo.

Las muestras de tejido se tomaron en la última fase de sacrificio. En la canal se seleccionó el músculo diafragmático, el cual separa la cavidad torácica de la cavidad abdominal. Para esto se tomó el músculo con el gancho para carne, con el fin de evitar posibles lesiones al momento del corte, con ayuda de un cuchillo se cortó un trozo no mayor a 5 cm de longitud y 3 cms de ancho, evitando el contacto con grasa periférica, la muestra fue dispuesta en el interior de una bolsa con cierre, limpias de primer uso, rotuladas con el número de muestra y el tejido que pertenece; conservándolas en cavas de hielo con geles refrigerantes para su adecuado transporte al laboratorio. Con el fin de mantener la inocuidad a la hora de la toma de muestras, se tuvo la precaución de limpiar el cuchillo con agua caliente en esterilizador después de cada corte de tejido. Este mismo procedimiento se realizó para la toma de muestra de riñón, el cual se ubica debajo de la ante-penúltima o penúltima costilla y la primera apófisis transversa lumbar (L1) en el riñón derecho y en el izquierdo lo ubicamos por debajo de la última costilla y la segunda a tercera apófisis transversa lumbar (L2 y L3).

4.4. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Los muestreos se realizaron según el cronograma, tomando en promedio un número no mayor a 10 muestras de tejido del músculo diafragmático y renal, una vez por semana en cada una de las PBM, para llevar a procesamiento en el laboratorio de Inocuidad de los Alimentos, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias -CUCBA- de la Universidad de Guadalajara, en Guadalajara, Estado de Jalisco, México; hasta completar el total de muestras requeridas.

Se estableció para el estudio, un promedio diario de 250 bovinos sacrificados en la PBM 1 y de 360 en la PBM 2. Para determinar el tamaño de muestra (n_0), se emplearon las siguientes formulas, tomando una probabilidad de éxito (p) del 5%, con una confianza (q) del 95% y una exactitud (e) del 3%:

$$n_0 = \frac{Z^2 * p * q}{e^2}$$

Reemplazando:

$$n_0 = \frac{1,96^2 * 0,05 * 0,95}{0,03^2} = 203$$

Al determinar el tamaño de la muestra, sobre la población conocida:

$$n_1 = \frac{n_0}{1 + \frac{(n_0 - 1)}{N}}$$

Para la PBM 1, con promedio de 250 bovinos sacrificados:

$$n_1 = \frac{203}{1 + \frac{(203 - 1)}{250}} = 112$$

Para la PBM 2, con promedio de 360 bovinos sacrificados

$$n_1 = \frac{203}{1 + \frac{(203 - 1)}{360}} = 130$$

Se tomaron en total 112 muestras de músculo diafragmático y 112 muestras de riñón en la PBM 1 y en la PBM 2, se tomaron 130 respectivamente. En cada visita se seleccionó una canal para muestreo, con un intervalo de acuerdo al total de bovinos sacrificados, de forma que en la PBM 1 cada 25 canales y en la PBM 2 cada 36 canales fueron tomadas las muestras. Las visitas se programaron una vez por semana, según autorización de cada director de PBM.

4.5. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Este es un método cualitativo para detectar residuos de inhibidores bacterianos en muestras de tejido músculo esquelético y renal proveniente de animales recién sacrificados. Se basa en una técnica microbiológica en caja de Petri con medio nutritivo sólido al cual se le incorpora un microorganismo sensible al antimicrobiano.

Se toma un disco de muestra de tejido por triplicado, y se intercalan tejidos de acuerdo a las manecillas del reloj, incubando a 37°C por 24 horas. Si la muestra contiene residuos de antibiótico o sulfamida en cantidad detectable, se inhibe el desarrollo del microorganismo, observándose un halo de inhibición alrededor de la muestra.

Como control positivo, en cada placa se posiciona un sensidisco con un inhibidor bacteriano seleccionado en una concentración determinada, que en un pH específico del medio de cultivo debe producir un halo de inhibición. Se emplearán tres placas con *Bacillus subtilis* BGA, con tres pHs diferentes, en la tabla 1 se indica el grupo de inhibidores que detecta particularmente cada placa.

Tabla 1. Determinación de antimicrobiano según pH del medio de cultivo

MICROORGANISMO	pH	ANTIMICROBIANO	SENSIDISCO
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	6	Penicilina	0,1 UI/mL
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	7,2	Sulfamidina	0,5 µg/mL
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8	Estreptomicina	0,4 µg/mL

Fuente: El autor

4.6. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

En la preparación de los agares se usaron diferentes reactivos, para lograr el medio ideal en el que el microorganismo (*B. subtilis*) se desarrollase mejor. Inicialmente se pesó en una balanza electrónica la cubeta o porcionador donde iban a ser depositados los reactivos, luego se taró la balanza y se pesaron los reactivos. Del agar bacteriológico fue tomado 1,56 gr, de peptona de carne 0,414 gr, de peptona de caseína 0,414 gr, de cloruro de sodio 0,612 gr y de fosfato de potasio monobásico ASC 0,12 gr. Después se vertieron al interior de un frasco Pírex de 250 mL, previamente rotulado con el pH al que se iba ser utilizado. El proceso se repitió para cada pH con el que se trabajó.

A cada frasco se le adicionaron 120 mL de agua destilada previamente medida en una probeta y se incorporó un agitador magnético, realizando este proceso para cada frasco; luego son llevados a una plancha térmica donde se mantuvieron hasta que los medios se homogenizaron adecuadamente (Imagen 2).



Imagen 2. Preparación de medios de cultivo

Posteriormente se pasaron a termo-baño (Baño María) que debe estar a 45°C para evitar la gelificación de los mismos, después se realizó el proceso de medición y regulación del pH. Para regular el pH de los medios de cultivo, se debe previamente calibrar el potenciómetro con las soluciones buffer (4, 7 y 10).

Puesto que el agua destilada que se usa para la preparación de medios está a un pH de 6, solo se ajusta el pH de los frascos rotulados 7,2 y 8. Para esto, se agregó Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0,01 Normal a los medios en cada frasco, y agitando para homogenizar, se introdujo el nodo del potenciómetro y se midió hasta llegar al pH requerido.

Los frascos fueron llevados a autoclave, donde los medios se esterilizaron a 121°C por 15 minutos, luego se pusieron en el termo-baño a 45°C; previamente fue retirado de refrigeración el *Bacillus subtilis* para que alcanzara una temperatura cercana al ambiente y se homogenizó en una plancha rotadora; se midieron 100 µL y cuando los frascos con los medios estuvieron atemperados a 45°C, se inoculó el *B. subtilis*, el medio fue homogenizado en un agitador Vortex. Con ayuda de una pipeta de 10 mL se vació la totalidad de cada medio en las cajas de Petri rotuladas de acuerdo al pH del medio respectivo. Todos los pasos de manipulación se realizaron con cada medio de cultivo esterilizado e inoculado se realizaron bajo mechero de Bunsen (Imagen 3).



Imagen 3. Esterilización de medios de cultivo

4.7. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA SENSIDISCOS

Los sensidiscos se realizaron perforando papel filtro (Whatman No. 4) con una perforadora, formando un círculo de 6 mm de diámetro a los cuales se les impregnó los antimicrobianos como preparación Standard, así:

Para la solución patrón de penicilina, se preparó una solución madre con penicilina G sódica de 50.000UI, de la que se derivaron dos soluciones hijas. Las soluciones se hicieron en tubos de ensayo esterilizados en autoclave, la solución madre se disolvió en 9 mL de agua destilada y se le adicionó 1 mg de penicilina (1.659UI), la primera solución hija se disolvió en 9 mL con 1 mL de la solución madre, la segunda solución hija en 9 mL de agua destilada con 1 mL de la primera solución hija. De la segunda solución se impregnaron los sensidiscos, quedando a 0,1 UI/mL. Las soluciones se conservaron en refrigeración entre 2 y 4°C en un máximo de 8 días.

Para la solución patrón de estreptomicina, se empleó estreptomicina en polvo de 25.0000UI, para preparar la solución madre, en 5 mL de agua destilada estéril se le agregaron 4 mg del antimicrobiano, a esta solución se le agregaron otros 5 mL de agua destilada obteniéndose una concentración de 0,3 µg/mL, de esta solución se impregnaron los sensidiscos. Se usó el mismo periodo conservación anterior.

La preparación de la solución patrón de sulfamidina, parte de una solución madre disuelta en 5 mL de etanol, a la cual se agregaron 5 mg del antimicrobiano en un matraz aforado de 10 mL, luego de agitar, se agregaron otros 5 mL de etanol; de esta solución se tomó 1 mL y se agregó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, resultando la solución hija con una concentración de 0,5 µg/mL de sulfamidina, de esta última solución se inocularon los sensidiscos y fue la misma conservación que en los anteriores métodos (Imagen 4).



Imagen 4. Preparación soluciones antimicrobianas

4.8. MÉTODO PARA SIEMBRA DE MUESTRAS

Se tomaron las muestras de tejido congelado y se pasaron a una bandeja metálica, cada muestra se llevaba a otra bandeja donde se obtenían los cilindros de muestras con saca-bocados esterilizado, ayudándonos de bisturí y pinzas de cirugía estériles, de estos cilindros se cortaron discos de 2 mm de grosor y un diámetro de 3 a 5 mm aproximadamente. Se realizaron 3 cortes de cada tejido (músculo y riñón) para cada pH (6; 7,2 y 8). Las muestras fueron posicionadas en las cajas de Petri siguiendo la dirección de las manecillas del reloj a un centímetro del borde, marcando en la caja de Petri el inicio del lugar de siembra, se intercalaron las muestras de músculo diafragmático y tejido renal de cada canal de bovino, para un total de 3 muestras de diferente canal en cada caja de Petri. Una vez sembradas las muestras, en el centro de la caja se posicionó un sensidisco de acuerdo al antimicrobiano que le corresponde el pH del medio, el cual se usó como testigo para determinar la presencia del antimicrobiano.

Todo el procedimiento se realizó bajo mechero de Bunsen. Posteriormente se colocaron las placas con los tejidos en la estufa bacteriológica a una temperatura de 32 a 35 °C por 24 horas para la observación de resultados. Todo el material

empleado en la siembra de muestras y lectura de los resultados fue esterilizado en autoclave para su descontaminación, y las cajas de Petri se lavaron adecuadamente para esterilizar en autoclave de calor seco a una temperatura de 180 °C por 60 minutos. Como control negativo se dispuso de tejido músculo esquelético obtenido a partir de carne importada de Canadá y Estados Unidos de América, certificada como libre de residuos de inhibidores bacterianos, a las que se les verificó por microbiología la negatividad a los mismos (Imagen 5).



Imagen 5. Incubación de cajas de Petri

4.9. LECTURA DE LAS PLACAS

Posterior a las 24 horas de incubación de las cajas de Petri, se tomó la lectura y el registro de los resultados (Imagen 5). Los sensidiscos usados como marcadores positivos dieron halos de inhibición con cual se dedujo que los medios de cultivos inoculados con el *Bacillus subtilis* BGA, funcionaban adecuadamente en presencia del antimicrobiano según el pH del medio (Imagen 6).

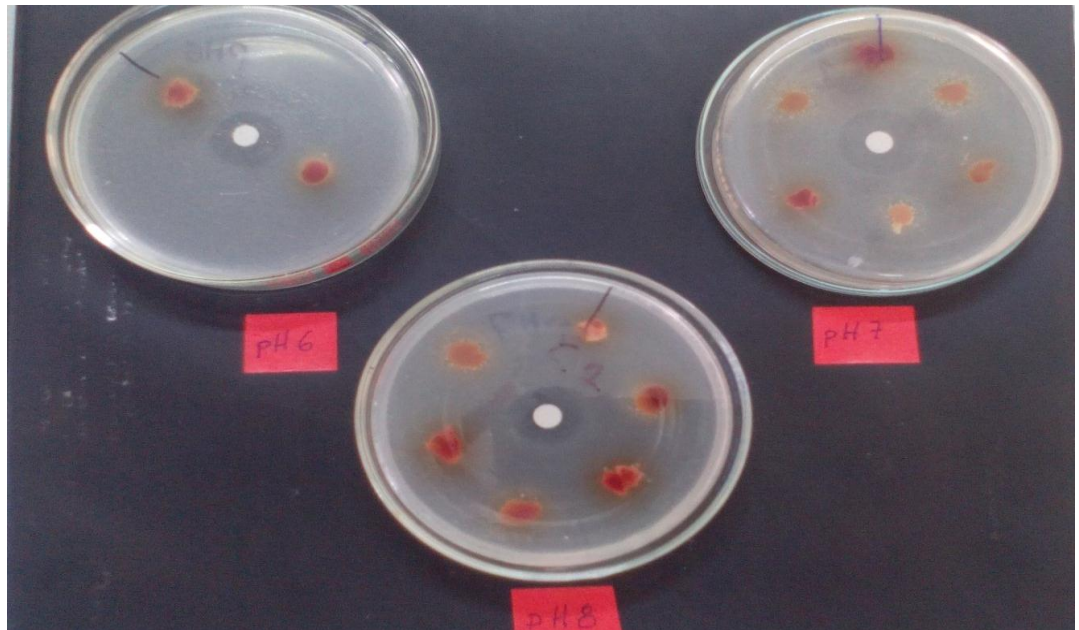


Imagen 6. Observación de halos

El diámetro en milímetros de los halos de inhibición se midió con un nonio o Escala de Vernier, tomando como negativo medidas menores a 2 mm (A) y positivo (B) medidas iguales o mayores a 2 mm (Imagen 6), según se muestra en la tabla 2, registrando las lecturas en un formato diseñado para este propósito (imagen 7):

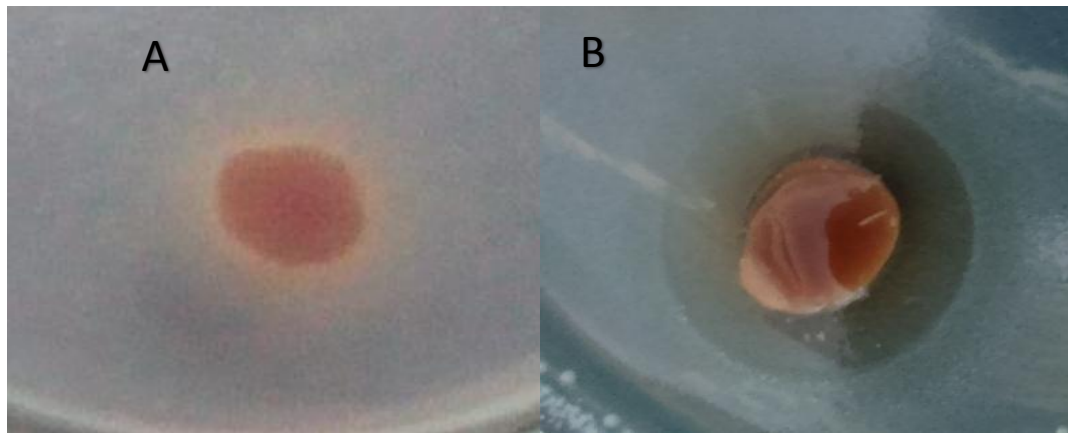


Imagen 7. Medida de los halos

Tabla 2. Registro de resultados según halo de inhibición

CONCEPTO	MEDIDA (mm)	LECTURA
Sin halo	0 mm	Negativo
Halo de inhibición unívoco	≥2 mm	Positivo

Fuente: El autor

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del análisis microbiológico se registraron en una base de datos en el programa Excel-2010 de Microsoft®, y se clasificaron en positivo o negativo, agrupándolos de acuerdo al antimicrobiano en estudio (Penicilina, Sulfamidina o Estreptomicina) relacionando la variable categórica con el tipo de tejido muestreado (Músculo esquelético o riñón) en cada una de las plantas de beneficio, en tablas de contingencia, sin relacionar las plantas entre sí. Los datos se analizaron por estadística no paramétrica, mediante prueba de Chi² utilizando el programa estadístico SPSS versión 23 para Windows, con nivel de significancia de 0,05.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la información obtenida en la detección de antimicrobianos en tejido músculo diafragmático y tejido renal de bovinos por método microbiológico de inhibición en tres placas utilizando *Bacillus subtilis* BGA, se encontraron los siguientes resultados:

A un pH de 6, para detección de Penicilina en músculo diafragmático, se obtuvieron 10 muestras positivas de un total de 242, encontrándose 7 de estas muestras en la PBM 1 y las 3 restantes en la PBM 2, lo que corresponde a un 4,13% del total de muestras; tenían concentraciones de penicilina mayores o iguales a la del sensidisco (0,1 UI/mL) usado como indicador positivo de antimicrobiano. Los datos se sometieron a estadística no paramétrica mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2), encontrándose que la detección de penicilina en músculo no está asociada estadísticamente a la planta de beneficio animal donde se tomaron las muestras, con una significancia (p) de 0,124 ($p \geq 0,05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución porcentual de penicilina en músculo en las PBM

Fuente de variación	N	Penicilina en músculo		χ^2
		%	Intervalo de	
Planta de beneficio 1	7/112	6,25	3,06-12,34	2360
Planta de beneficio 2	3/130	2,31	0,79-6,57	
TOTAL	10/242	4,13	2,26-7,44	

gl= 1

P= 0,124

En penicilina en riñón, se detectaron 10 muestras positivas, dando un resultado porcentual similar al de penicilina en músculo de 4,13% sobre el total de muestras, aunque en este caso todas las muestras positivas se encontraron en la PBM 1. En la prueba de Chi cuadrado para penicilina en riñón se obtuvo una significancia (p) de 0,001 ($p \leq 0,05$), de lo cual se podría inferir que los resultados positivos están relacionados a la planta de beneficio, pero al realizar la prueba exacta de Fisher, nos arroja como resultado 0,000 que es menor que α (0,05), lo que nos indica que las variables son independientes (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución porcentual de penicilina en riñón en las PBM

Fuente de variación	N	Penicilina en riñón		χ^2
		%	Intervalo de	
Planta de beneficio 1	10/112	8.04	4.29-14.57	12107
Planta de beneficio 2	0/130	0,00	0,00-2,87	

TOTAL	10/242	4,13	2,26-7,44
gl=1			
P= 0,001			
Fisher= 0,000			

Se realizó la prueba no paramétrica de Chi cuadrado para penicilina en músculo y riñón, denotando que con relación a este antimicrobiano, hay relación en la presencia de muestras positivas en tejido muscular y renal al dar una significancia (p) de 0,010 ($p \leq 0,05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Chi cuadrado penicilina músculo y riñón

		Penicilina riñón			X²
		Negativo	Positivo	Total	
Penicilina músculo	Negativo	224	8	232	6630
	Positivo	8	2	10	
	Total	232	10	242	

gl=1
P= 0,010
Fisher= 0,058

En el pH de 7,2 para la detección de Sulfamidina en músculo diafragmático, ninguna de las muestras dio positivo en el análisis microbiológico (0%), por lo que no se le realizó la prueba estadística no paramétrica de Chi cuadrado (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución porcentual de sulfamidina en músculo en las PBM

Fuente de variación	Sulfamidina en músculo			X²
	N	%	Intervalo de	
Planta de beneficio 1	0/112	0	0,00-3,32	0,000

Planta de beneficio 2	0/130	0	0,00-2,87
TOTAL	0/242	0	0,00-1,56

En sulfamidina en riñón se encontraron 11 muestras positivas equivalentes al 4,55% del total de muestras tomadas, encontrando 7 casos positivos en la PBM1 y 4 casos en la PBM2, esto nos permite deducir que las muestras de riñón tenían concentraciones de Sulfamidina mayores o iguales a la del sensidisco (0,5 µg/mL) usado como indicador positivo de antimicrobiano. En la prueba de Chi cuadrado para sulfamidina en riñón se obtuvo una significancia (p) de 0,237 ($p \geq 0,05$), valor que demuestra que no hay relación entre la presencia de antimicrobianos y la planta de beneficio animal de donde se obtuvieron las muestras del estudio (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución porcentual de sulfamidina en riñón en las PBM

Fuente de variación	Sulfamidina en riñón			
	N	%	Intervalo de Confianza	X ²
Planta de beneficio 1	7/112	6,25	3,06-12,34	1,396
Planta de beneficio 2	4/130	3,08	1,20-7,64	
TOTAL	11/242	4,55	2,56-7,95	

gl= 1
P= 0,237

Para sulfamidina en músculo y sulfamidina en riñón no se realizó estadística no paramétrica de chi cuadrado (tablas cruzadas de 2x2) al no encontrarse resultados positivos en las muestras de sulfamidina en músculo (Tabla 8).

Tabla 8. Chi cuadrado sulfamidina músculo y riñón

		Sulfamidina riñón		
Sulfamidina músculo		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
	NEGATIVO	231	11	242
	POSITIVO	0	0	0
	TOTAL	231	11	242

Al pH 8 para la detección de Estreptomicina en músculo diafragmático no se obtuvo ninguna muestra positiva (0%) y al igual que en el caso de sulfamidina en musculo no se le realizó la prueba estadística no paramétrica de Chi cuadrado al no haber datos positivos (Tabla 9).

Tabla 9. Distribución porcentual de Estreptomicina en músculo en las PBM

Fuente de variación	Estreptomicina en músculo			
	N	%	Intervalo de	χ^2
Planta de beneficio 1	0/112	0	0,00-3,32	0,000
Planta de beneficio 2	0/130	0	0,00-2,87	
Total	0/242	0	0,00-1,56	

En tejido renal para la detección de estreptomicina se encontraron 9 muestras positivas, 8 en la PBM1 y 1 en la PBM2 correspondiendo al 3,72% del total de las muestras. Para la prueba de chi cuadrado en estreptomicina en riñón, la significancia de fue de 0,009 ($p \leq 0,05$), pero al igual en el caso para penicilina en músculo, la prueba exacta de Fisher que en este caso es de 0,013 menor que α (0.05) también nos arroja como resultado que no hay relación entre los casos positivos y las plantas de beneficio municipales de las que fueron tomadas las muestras (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución porcentual de Estreptomicina en riñón en las PBM

Fuente de variación	Estreptomicina en riñón			
	N	%	Intervalo de	X ²
Planta de beneficio 1	8/112	7,12	3,06-12,34	6,826
Planta de beneficio 2	1/130	0,77	1,20-7,64	
TOTAL	11/242	3,72	1,96-6,92	

gl= 1

P= 0,009

Fisher= 0,013

Para estreptomicina en músculo y en riñón, no se realizó estadística no paramétrica de chi cuadrado (Tablas cruzadas de 2x2) al no encontrarse resultados positivos en las muestras de estreptomicina en músculo (Tabla 11).

Tabla 11. Chi cuadrado Estreptomicina músculo y riñón

		Estreptomicina riñón		
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL
Estreptomicina músculo	NEGATIVO	233	9	242
	POSITIVO	0	0	0
	TOTAL	233	9	242

El método microbiológico también arrojó como resultado que de 40 (16,5%) muestras positivas, 30 (2,1%) de ellas fueron detectadas en riñón y las restantes 10 (0,7%) en músculo, esto debido a que el riñón es el organismos encargado de la mayoría de la eliminación de sustancias tóxicas, como lo sugieren Orozco et. Al. (2006) en estudio sobre residuos de penicilina y tetraciclina en cerdo, realizado en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la universidad de Guadalajara (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución porcentual de muestras.

Detección	Antimicrobianos						TOTAL
	PM	PR	SM	SR	EM	ER	
Positivo	10 4,1 %	10 4,1 %	0 0 %	11 4,5%	0 0 %	9 3,7 %	40 16,5 %
Negativo	232 95 %	232 95 %	242 100 %	231 95,5%	242 100%	233 96,3	202 83,5
Total	242 100 %	242 100 %	242 100 %	242 100 %	242 100 %	242 100 %	242 100 %

Tomando en cuenta las condiciones económicas de México y su gastronomía, las vísceras representan una opción nutricional más barata que las porciones musculares, aunque su consumo frecuente podría implicar una exposición a niveles de residuos por arriba de los límites máximos permitidos como lo sugieren Hernández y Lazarin (2007). Estos resultados obtenidos demuestran que el método microbiológico de inhibición en placa, utilizando *Bacillus subtilis* BGA permite la detección de antimicrobianos a diferentes pH (6; 7,2 y 8) en tejido muscular y renal, como lo corrobora el trabajo de investigación de Pérez (2005) en la Universidad de Belgrano en Argentina, quien realizó una serie de ensayos de familiarización con la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas mediante el método de cuatro placas del Centro Nacional de Estudios Veterinarios y Alimentarios (CNEVA) de Francia, analizando muestras de músculo esquelético animal fortificadas en laboratorio con cantidades conocidas de antibióticos o sulfamidas, encontrando que la técnica es de gran utilidad debido a la baja incidencia de residuos de sustancias inhibitoras en carnes y al hecho de que permiten el análisis de una gran cantidad de muestras a un bajo costo.

6. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la capacidad del método microbiológico de inhibición en placa utilizando *Bacillus subtilis* BGA para la detección de tres antimicrobianos en músculo y riñón; fueron usados antimicrobianos de la familia de los β -láctamicos (Penicilina), de las Sulfas (Sulfamidina) y de los aminoglucósidos (Estreptomina).

La prueba mostró una buena capacidad a la hora de detectar antimicrobianos en el tejido renal y muscular y una buena sensibilidad al actuar a concentraciones muy bajas de los antimicrobianos. También resulta ser una prueba bastante eficaz dado que todos los materiales y reactivos utilizados para la estudio son de fácil acceso en los laboratorios y el método es bastante comprensible a la hora de realizarlo teniendo en cuenta que los procedimientos son sencillos de llevar cabo, haciendo los costos de operaciones y de realización de este método, asequible.

La presencia de antimicrobianos en las muestras tomadas nos indica que los animales muchas veces están siendo expuestos a estos inhibidores bacterianos semanas o hasta días antes de ser llevados a las plantas de beneficio municipales y que hay una falta de vigilancia hacia los tiempos de retiro de los fármacos previo al envío de los animales a sacrificio.

Este método también rápido a la hora de la obtención de resultados puesto que se puede hacer lectura de las muestras a las 24 horas después de que estas han sido sembradas y eficiente ya que por caja de Petri se pueden sembrar 3 muestras diferentes de músculo diafragmático y de riñón tomados cada uno de una canal diferente, haciendo posible que se siembren una gran cantidad de muestras por día. Aunque los métodos microbiológicos no llegan a ser tan sensibles como lo métodos cuantitativos, sí resultan ser muy útiles por los bajos costos que representa, por ser n método sencillo de realizar y porque se pueden analizar una gran cantidad de muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anadón AR, Martínez-Larrañaga MR. 1999. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*; 59:183-98.
2. Anadón AR. 2007. Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. Instituto de España. Real academia de Ciencias Veterinarias.
3. Anderson TH. 2003 Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Ag. Ecosystem Environ*. 98:285-293.
4. Angelini TE, Roper M, Kolter R, Weitz D, Brenner MP. 2009. *Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant. Vol. 106. No. 43. 18109–18113.
5. Baraton Y. 2006. Compagnie Laitiere Europeenne Production et services. Folleto sanidad alimentaria. Brussels, Belgium, pp 26-28.
6. Bavera G, Bocco O, Beguet H, Petryna A. 2002. Promotores del crecimiento y modificadores del metabolismo. Cursos de Producción Bovina de Carne, F.A.V. UNRC. En: www.produccion-animal.com.ar
7. Bergeys D. 1989 - 2000. Manual of the Determinative Bacteriology. Night Edition Philadelphia 2: 540-589.
8. Bogaerts R, Wolff F. 1985. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtsch*. No. 60 (4) 672 – 673.
9. CAC-ATCC.2007. Codex Alimentarius Colombia y Asistencia técnica al comercio en Colombia. Guía práctica Codex Alimentarius Colombia.
10. Cancho-Grande B, García-Falcón MS, Simal-Gándara J. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual, *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol. 3, N°1: 39-47.
11. CCE. 2002. Decisión de la Comisión 2002/657/CE del 12 de agosto de 2002 Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 17(221):8-36.
12. Chávez H. 2014. El Financiero. mexicanos devoran carne y más recursos naturales. En: <http://www.elfinanciero.com.mx/mas/enfoques/mexicanos-devoran-carne-y-mas-recursos-naturales.html>
13. Chico J, Rúbiesb A, Centrichb F, Companyóa R, Prata MD, Granados M. 2008. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Volume 1213, Issue 2, 12 December, Pag: 189-199.
14. Clavijo G. 2015. Controlan residuos de fármacos en carne bovina. Universidad Nacional de Colombia. UN Periódico impreso No. 191. En: <http://www.unperiodico.unal.edu.co/dper/article/controlan-residuos-de-farmacos-en-carne-bovina.html>

15. *Codex Alimentarius* Commission, 2007, Codex Committee on Food Import and Export Certification and Inspection Systems (CX-733). Seventeenth edition, 164-165.
16. Conpes 3375. 2005. Política nacional de sanidad agropecuaria e inocuidad de alimentos para el sistema de medidas sanitarias y fitosanitarias. Documento Consejo Nacional de Política Económica y Social. 39 p.
17. _____. 3676. 2010. Consolidación de la política sanitaria y de inocuidad para las cadenas láctea y cárnica. Documento Consejo Nacional de Política Económica y Social. 84 p.
18. Cota-Rubio E, Hurtado-Ayala L, Pérez-Morales E, Alcántara-Jurado L. 2014. Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. Revisión sistemática. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. Mayo. Vol. 1 No. 1.
19. Domínguez R. 2012. Aplicaciones de los derivados sulfónicos y de los sulfatos de alquilo. *MoleQla. Revista de Química de la Universidad Pablo de Olavide*. No. 6. Junio 2012.
20. Domínguez-Domínguez EM. 2012. La solución a un gran problema. *Revista de Química de la Universidad Pablo de Olavide*. No. 6. Junio 2012.
21. Donald C; Plumb P. 2010. Manual de farmacología veterinaria. Editorial Buenos Aires. 6 ed. AR. 1235 P.
22. Doyle ME. 2006. Veterinary drug residues in processed meats-Potential health risk. A review of the scientific literature. Fri Briefings, Food Research Institute, University of Wisconsin En: http://www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf
23. Espinosa de los Monteros JJ. 2005. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis doctoral en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca.
24. Errecalde JO. 2004. Bacterias resistentes en medicina veterinaria en: Uso de antimicrobianos en animales de consumo, incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Food and Agriculture Organization. pp 31.
25. Fajardo A, Méndez F, Molina L. 2011. Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano: Revisión. *Universitas Scientiarum*. 16(1):77-91.
26. Falcón N, Ortega C, Gorniak S, Villamil LC, Ríos C, Simón MC. 2010. El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Una Salud. *Revista Sapuvet de Salud Pública*, N° 1. 75-88 pp
27. FAO. 2002. Organización de las Naciones Unidas, para la Alimentación y la Agricultura. Principios generales de higiene de los alimentos. S.I. 2ª ed. S.n.t. v1B. 80 p
28. _____. 2006. Seminario Latinoamericano sobre rastreabilidad de productos. Consultado: 01/04/2016. En: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/agns/informe.pdf>

29. FAO. 2014. _____. FAO-FAOSTAT. Perspectivas alimentarias. Resúmenes de mercado. Consultado: 07/06/2016. En: <http://www.fao.org/3/a-i4137s.pdf>
30. Faustman E, Ommen G. Risk assessment. 2001. In: Klaasen C (editor). Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. 6th edition. New York: McGraw Hill; p107-27
31. Gatica C, Gesche E. 2007. Método de las 5 placas para la detección de residuos de antibacterianos en leche. Revista Científica. (Maracaibo) En: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-2592007000300004&lng=es
32. Gimeno O, Ortega C. 2007. Resistencia bacteriana a los antibióticos: implicaciones en salud pública veterinaria. *Revista de Salud Pública Veterinaria* (Bolivia) 2(1):8-9.
33. Gratacós M. 2007. Desarrollo de Métodos Rápidos para el Análisis de Residuos en Producción Animal. Tesis de Doctorado. Universidad de Girona.
34. INEGI. 2014. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadística de sacrificio de ganado en rastros municipales por entidad federativa 2009-2014. Boletín de prensa No. 131/15. Aguascalientes. Consultado: 01/04/2016. En: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/boletines/2015/especiales/especiales2015_03_9.pdf
35. _____. 2015. Congreso Internacional de la carne. Proteína animal. Consultado: 01/04/2016. En: <http://www.ameq.org.mx/estadisticas/nacional/produccion/>
36. Lozano MC, Arias DC. 2008. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21(1):121-135.
37. Malgor LA, Valsecia ME. 2000. Farmacología Médica. Volumen 3. Farmacología Antimicrobiana. Farmacología Dermatológica. En: http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temasfarma/indice_v3.htm
38. Moreno GB. 2003. Higiene e inspección de carnes. Vol II. España: Días de Santos. 624 p.
39. MPS. 2007. Ministerio de la Protección Social. Decreto 1500 de 2007. Bogotá. Colombia.
40. Myllyniemi AL. 2004. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat: Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. 87 p.
41. Navas ME. 2012. El riesgo de usar antibióticos en animales. En: http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2012/04/120412_antibioticos_animales_resistencia_men.shtml
42. OCDE-FAO. 2005. Organización para la cooperación y el desarrollo económico - Organización de las naciones unidas para la agricultura y la

- alimentación. Perspectivas agrícolas OCDE-FAO 2005-2014. Consultado: 04/04/2016. En: <http://www.fao.org/docrep/008/y9492s/y9492s08.htm>
43. Okolo MI. 1986. Bacterial drug resistance in meat animals. A review *International Journal Zoonosis*. México DF. MX.
 44. Orozco A, Ávalos E, Gonzáles D, Pacheco C, Ramírez A, Kühne M. 2006. Residuos de penicilina y tetraciclina en cerdo. Avances en la investigación científica en el CUCBA. ISBN: 970-27-0770-6. 620-626.
 45. Paige JC, Tollefson L, Miller MA. 1999. Health implications of residues of veterinary drugs and chemicals in animal tissues. *Veterinary Clinic North American Food Anim Practice*. 15:31-43.
 46. Pérez JI. 2005. Ensayos de familiarización en la técnica de detección de residuos de antibióticos y sulfamidas en músculo esquelético animal por el método de las cuatro placas. Tesis Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Belgrano Buenos Aires. Argentina.
 47. Pikkemaat MG. 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 395 (4):893.
 48. Realpe ME, Hernández CA, Agudelo CI. 2002. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. Imágenes en biomedicina. <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/viewFile/1148/1263>
 49. SAGARPA. 2011. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Jalisco pilar en la producción de carne en México. Consultado: 01/04/2016. En: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/jalisco/boletines/Paginas/B0762011.aspx>
 50. _____. 2014. Producción de carne por municipio. Consultado: 01/04/2016. En: <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-municipal-pecuario/>
 51. _____. 2015. Ganadería bovina y sus derivados. Consultado: 01/04/2016. En: <http://www.gob.mx/sagarpa/articulos/ganaderia-bovina-y-sus-derivados>
 52. Sumano HS, Ocampo L. 2006. Farmacología veterinaria. México: McGraw-Hill Interamericana. Tercera edición. 169-207, 235-247, 830-832, 1061, 1092 pg.
 53. Torsten S. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*. Vol.56, Issue 4, pp 845-857.
 54. UGR.BJ. 2009. Unión ganadera regional de Baja California. Estudio de mercado y sistema de comercialización para la exportación de carne a EUA, Europa y Asia de la planta TIF de la UGR-BC. Consultado: 04/04/2016. En: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/UGRBC.pdf

55. Villar D; olivera M; Ruiz J, Chaparro J. 2012. Aproximación al tema de residuos antimicrobianos y antiparasitarios en leche: límites permisibles y tiempo de retiro. S.n.t. 1-84 p.
56. Woodward KN. 2005. Veterinary pharmaco vigilance. Part 4. Adverse reactions in humans to veterinary medicinal products, *Journal Veterinary Pharmacology Therapy*. 28:185-201
57. Zuñiga A. 2014. El Universal. Jalisco es segundo en producción de carne de bovino. Consultado 04/04/2016. En: <http://www.unionjalisco.mx/articulo/2014/11/25/economia/guadalajara/jalisco-es-segundo-en-produccion-de-carne-de-bovino>